

Aus der Medizinische Klinik und Poliklinik IV  
Abteilung für Klinische Pharmakologie  
Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. M. Reincke

**RIG-I-like receptor-basierte Immuntherapie des  
Pankreaskarzinoms und die Rolle von *myeloid-derived  
suppressor cells***

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Sabrina Kirchleitner  
aus München

2020

---

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Max Schnurr

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. M. Haas  
Prof. Dr. T. Brocker

Mitbetreuung durch die PD Dr. rer. biol. hum. Peter Düwell  
promovierten Mitarbeiter: Prof. Dr. med. Stefan Endres

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 03.12.2020

---

Meiner Mama

---

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b>	<b>3</b>
1.1.1 Pankreaskarzinom .....	3
1.1.1 Therapie und Tumormikroenvironment.....	3
1.1.2 Pankreaskarzinommodelle .....	4
1.2 Myeloid-derived suppressor cells .....	4
1.2.1 Charakterisierung .....	4
1.2.2 Suppressionsmechanismen .....	5
1.3 RIG-I-like Rezeptoren .....	6
1.3.1 RLR-Familie .....	6
1.3.2 Liganden und Signaling .....	6
1.3.3 Typ-I-Interferon .....	6
1.3.4 RLR-Liganden für die Therapie von Pankreaskarzinomen.....	7
<b>2. Ergebnisse (veröffentlichte Originalarbeiten)</b>	<b>8</b>
2.1 RIG-I-like helicases induce immunogenic cell death of pancreatic cancer cells and sensitize tumors toward killing by CD8 <sup>+</sup> T cells .....	8
2.2 Targeted activation of melanoma differentiation-associated protein 5 (MDA5) for immunotherapy of pancreatic carcinoma.....	8
2.3 Immunostimulatory RNA leads to functional reprogramming of myeloid-derived suppressor cells in pancreatic cancer .....	8
2.4 Erklärung zum Eigenanteil .....	9
<b>3. Zusammenfassung und Diskussion</b>	<b>10</b>
3.1 Grundlagen der RLR-Therapie .....	11
3.2 Immunogener Zelltod nach Therapie mit RLR-Liganden.....	11
3.3 Tumorzelltod durch zytotoxische T-Zellen .....	12
3.4 Antigenpräsentation und DC-Aktivierung .....	12
3.5 Rolle der MDSC bei RLR-Therapie .....	13
3.6 IFN-abhängige Therapieeffekte auf MDSC.....	14
3.7 Antigenpräsentation durch MDSC .....	15
3.8 Ausblick.....	15
<b>4. Summary and discussion</b>	<b>17</b>
4.1 Principles of RLR therapy in PDAC .....	17
4.2 Immunogenic cell death after therapy with RLR ligands .....	17
4.3 Tumor cell death by cytotoxic T cells.....	18
4.4 Antigen presentation and DC activation.....	18

---

4.5 Role of MDSC in RLR therapy.....	19
4.6 IFN-dependent therapy effects on MDSC.....	19
4.7 Antigen presentation by MDSC .....	20
4.8 Outlook .....	21
<b>5. Literaturverzeichnis</b>	<b>22</b>
<b>6. Verzeichnis der Abkürzungen</b>	<b>31</b>
<b>7. Danksagung</b>	<b>33</b>
<b>8. Appendix</b>	<b>34</b>
8.1 Lebenslauf .....	34
8.2 Publikationen .....	36
8.2.1 Originalarbeiten.....	36
8.2.2 Abstracts .....	37
8.2.3 Wissenschaftliche Vorträge und Poster .....	39
8.3 Eidesstattliche Versicherung .....	41
8.4 Kumulative Dissertation.....	42

# 1. Einleitung

## 1.1.1 Pankreaskarzinom

### 1.1.1 Therapie und Tumormikroenvironment

Bei der Behandlung des Pankreaskarzinoms spielt die Zusammensetzung der *tumor microenvironment* (TME) eine entscheidende Rolle. Während in vielen anderen Tumorentitäten im letzten Jahrzehnt Immuntherapeutika die Behandlungsregime revolutioniert haben [4, 5], bleibt die Therapie des Pankreaskarzinoms im Wesentlichen unverändert. Die chirurgische Resektion, sofern diese möglich ist, und Chemotherapie bilden hierbei die bislang wichtigsten Behandlungsoptionen [6, 7]. Abhängig vom Gesundheitszustand des Patienten können aggressivere Chemotherapie-Protokolle wie FOLFIRINOX (Fluorouracil, Leucovorin, Irinotecan und Oxaliplatin) und nab-Paclitaxel mit Gemcitabine das Überleben für einige Monate verlängern [8, 9]. Oft begrenzt hierbei jedoch die Toxizität den Einsatz.

Eine gezielte Therapie, beispielweise mit Inhibitoren von Wachstumsfaktorrezeptoren (EGFR-Inhibitor [10], Tyrosinkinase-Inhibitoren [11]), von Angiogenese (VEGF-Inhibitoren [12, 13]), des Tumorstromas (Matrixmetalloproteinase [14], Hyaluronsäure [15]), oder des KRAS-Signalwegs (MEK-Inhibitor [16], PI3K-Inhibitor [17]), konnte bisher nur mit Erlotinib (EGFR-Inhibitor) erfolgreich umgesetzt werden [18, 19].

Der Einsatz von Immuntherapeutika verlief bisher weitgehend enttäuschend [20, 21]. Checkpoint-Inhibitoren, wie beispielsweise anti-CTLA4- und anti-PD-1-Antikörper, zeigten nur für ein kleines Patientenkollektiv versprechende Erfolge [22]; dennoch wurde Pembrolizumab von der FDA für Patienten mit Mikrosatelliten-instabilen Tumoren, inklusive Pankreaskarzinomen, zugelassen [23, 24]. Verschiedene Vakzinierungsstrategien mit Tumorzelllysate [25], rekombinanten Peptiden [26], oder vektorbasierte Impfstoffe [27], konnten in klinischen Studien zwar eine Induktion von tumorantigenspezifischen T-Zellen zeigen, das Überleben jedoch nicht verlängern.

Gründe für das Versagen der Immuntherapie liegen zum einen in der geringen Mutationslast und der damit einhergehenden niedrigen Zahl an Neo-Antigenen, zum

anderen an der stark immunsuppressiven TME aus dichtem fibrotischem Stroma und immunsuppressiven Immunzellpopulationen [28-31]. Um die immunsuppressiven Anteile der TME, wie z. B. *myeloid-derived suppressor cells* (MDSC) und Tumor-assoziierte Makrophagen (TAM), gezielt zu adressieren, wurde zum einen versucht mit Zoledronsäure die MDSC-Population zu depletieren [32] und zum anderen mittels CCR2-Inhibitoren die Rekrutierung von M2-polarisierten Makrophagen in den Tumor zu verhindern [33]. Beide Medikamente konnten jedoch keine Überlegenheit gegenüber der etablierten Standardtherapie demonstrieren [34].

### 1.1.2 Pankreaskarzinommodelle

In der vorliegenden Arbeit wurden syngene orthotope Pankreaskarzinommodelle verwendet, wie beispielsweise das Panc02 Modell [1, 2], welches aggressive Tumore mit einer stark ausgeprägten immunsuppressiven TME ausbildet, und das T110299 Modell [1-3], welches aus genetisch modifizierten Mausmodellen (GEMM; hier: LSL-Kras<sup>G12D/+</sup> LSL-Trp<sup>53R172H/+</sup> Pdx1-Cre (KPC)) entstammt [35]. Letzteres besitzt, ähnlich dem humanen Pankreaskarzinom, genetische Instabilitäten, welche eine desmoplastische Stromareaktion hervorrufen und folglich eine gewisse Therapieresistenz widerspiegeln [35-37].

## 1.2 Myeloid-derived suppressor cells

### 1.2.1 Charakterisierung

Eine Population von Zellen myeloiden Ursprungs, mit der Fähigkeit eine T-Zell-Immunität zu unterdrücken, sind *myeloid-derived suppressor cells* (MDSC) [38]. Sie entstehen unter dem systemischen Einfluss eines Malignoms aus myeloiden Vorläuferzellen und werden unterteilt in PMN-MDSC mit polymorphem Kern und monozytäre M-MDSC [38]. Für ihre Identifizierung wird die T-Zell-Suppressivität sowie die Expression bestimmter Oberflächenmoleküle (PMN-MDSC: CD45<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> Ly6G<sup>+</sup> Ly6C<sup>int</sup>; M-MDSC: CD45<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> Ly6G<sup>-</sup> Ly6C<sup>high</sup>) vorausgesetzt [38]. MDSC können die Immunantwort hemmen und Tumorwachstum begünstigen [39, 40], weshalb sie in verschiedenen Tumorentitäten, u. a. auch im Pankreaskarzinom, mit einer schlechten Prognose assoziiert sind [41, 42]. Vom Tumor werden dabei

Faktoren produziert, die eine Expansion des myeloiden Kompartments und eine Mobilisation aus dem Knochenmark veranlassen (GM-CSF, G-CSF, IL-6) [43]. Ähnlich wie tumorassoziierte Makrophagen (TAM), die unter pathologischen Konditionen eine alternative (M2) Aktivierung erfahren, spricht man auch bei MDSC von einer klassischen M1- und einer alternativen M2-Polarisierung [44]. Durch die Ausschüttung beispielsweise von TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$  und IL-6 von Tumorzellen wird die pathologische Aktivierung vermittelt [44, 45]. Während ein M2-Phänotyp generell als immunsuppressiv und tumorfördernd gilt, sind M1 Zellen immunaktivierend und unterscheiden sich in ihrem Expressions- und Zytokinprofil. M2-Marker sind beispielsweise der Mannose-Rezeptor (CD206), TGF- $\beta$ , VEGF, Arginase und Galectin-9, sowie die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie STAT3, STAT5B und STAT6 [46]. Eine klassische M1-Aktivierung ist durch die Sekretion immunaktivierender Zytokine (IL-12, TNF- $\alpha$ ), STAT1 Aktivierung und zytotoxischer Funktion (Produktion von reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffradikalen) gekennzeichnet [47].

### 1.2.2 Suppressionsmechanismen

MDSC weisen verschiedene suppressive Mechanismen auf, die von Faktoren des umgebenden Milieus beeinflusst werden. Eine Inhibierung der T-Zell-Proliferation und T-Zell-Apoptose verursacht die Depletion essentieller Aminosäuren, wie Arginin und Tryptophan, durch Arginase 1 (ARG1) bzw. Indoleamin-2,3-Dioxygenase 1 (IDO1) [48]. NOX und iNOS katalysieren die Erzeugung von reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies (ROS, NOS), die wiederum den T-Zell-Rezeptor in seiner Funktion stören und zum Proliferationsstopp der T-Zelle führen [47]. Die Oberflächenexpression von PD-L1 durch MDSC inhibiert T-Zellen bei direktem Zell-Zell-Kontakt [49]. Außerdem sezernieren MDSC immunsuppressive Zytokine wie TGF- $\beta$  und IL-10, die zur Induktion von regulatorischen T-Zellen, M2-Polarisierung von Makrophagen und NK-Zell-Hemmung führen [46]. Zudem werden Chemokine freigesetzt, die zur Rekrutierung weiterer suppressiver Zellen beitragen [50]. Aufgrund ihrer Plastizität ist es schwierig, gezielte Therapien gegen MDSC zu entwickeln. Bisherige Strategien konzentrierten sich hauptsächlich auf ihre Reduktion und Unterbindung ihrer Rekrutierung [32-34, 51, 52]. Depletion bzw. Umprogrammieren von MDSC von M2 zu M1-Zellen stellen weitere interessante Therapiestrategien zur Umgehung der Immunsuppression des Tumors dar.



## 1.3 RIG-I-like Rezeptoren

### 1.3.1 RLR-Familie

Zur Familie der *retinoic acid-inducible gene like receptors* (RLR) gehören *retinoic acid inducible gene 1* (RIG-I), *melanoma differentiation-associated gene 5* (MDA5) und *laboratory of genetics and physiology 2* (LGP2). Es handelt sich um stark konservierte und weitläufig exprimierte zytosolische DExD/H-Box-RNA-Helikasen, die als Erkennungsrezeptoren für Virusinfektionen eine wichtige Rolle im angeborenen Immunsystem spielen.

### 1.3.2 Liganden und Signaling

RIG-I erkennt kurze (<1 kB) Doppelstrang-RNA mit 5'-Triphosphat-Ende (ppp-RNA), während MDA5 längere (> 2 kB) Doppelstrang-RNA (dsRNA), abhängig von der Sekundärstruktur [53], bindet. MDA5 wird zudem durch das synthetische dsRNA-Analogon *polyinosinic:polycytidylic acid* (Poly(I:C)) aktiviert, welches derzeit als Adjuvans und potenzielles Tumorthapeutikum getestet wird [54, 55]. Poly(I:C) und ppp-RNA können mit Polyethylenimin (PEI) Komplexe bilden, die eine intrazelluläre Aufnahme bei der Transfektion sicherstellen. Die im aktivierten Zustand exponierte *caspase activation and recruitment domain* (CARD) von RIG-I oder MDA5 interagieren mit den CARD Molekülen von *mitochondrial antiviral-signaling protein* (MAVS). MAVS formt große Funktionskomplexe, die über eine Signalkaskade schließlich zur Aktivierung der Transkriptionsfaktoren *interferon regulatory factor 3* (IRF3) und *7* (IRF7) führen. Über *nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B cells* (NF-κB) werden Typ-I- und Typ-III-Interferone (IFN) induziert [56-58].

### 1.3.3 Typ-I-Interferon

Im Falle einer akuten Virusinfektion erfüllen Typ-I-Interferone in Immunzellen essenzielle Aufgaben: Auto- und parakrin binden die Interferone an Typ-I-IFN-Rezeptoren und aktivieren die *Janus kinase/signal transducers and activators of transcription* (JAK-STAT) Signalkaskade. Dies führt zur Induktion von einer Vielzahl von *interferon-stimulated genes* (ISG), wodurch eine antivirale IFN-Antwort ausgelöst wird. Durch die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine wird die antivirale

Immunfunktion induziert, die Antigenpräsentation von dendritischen Zellen (DC) verbessert und natürliche Killerzellen (NK) sowie zytotoxische T-Zellen aktiviert [59]. Bei hoher Viruslast in der infizierten Zelle kann zusätzlich durch die Aktivierung von Caspasen der Zelltod eingeleitet werden [60].

Insgesamt führt dies zum Absterben infizierter Zellen, zum Schutz der umgebenden Zellen und zur Aktivierung der antigenspezifischen antiviralen Immunantwort, sodass eine akute Virusinfektion unter Kontrolle gebracht werden kann. Im chronischen Zustand, was beispielsweise bei Tumorerkrankungen zu beobachten ist, haben Typ-I-IFN eine zweiseitige Rolle. Einerseits induzieren sie die Expression von *major histocompatibility complex-I* (MHC-I) auf der Oberfläche von Tumorzellen und sorgen so für vermehrte Antigenpräsentation [61], andererseits wird die Expression von immunsuppressivem PD-L1 induziert [62, 63], Metastasierung gefördert und Stammzeleigenschaften der Tumorzellen erhalten [64].

#### 1.3.4 RLR-Liganden für die Therapie von Pankreaskarzinomen

Beim Einsatz von Radio- und Chemotherapie kommt es zum Absterben von Tumorzellen. Einige Chemotherapeutika können einen immunogenen Zelltod induzieren. Die Immunreaktion die dabei gegen die Tumorzelle ausgelöst wird, ähnelt derjenigen bei einer Virusinfektion [65, 66]. Eine vielversprechende Taktik für die Immuntherapie des Pankreaskarzinoms ist die Imitation einer viralen Infektion durch synthetische RNA-Moleküle als RLR-Liganden. So können antivirale Immunmechanismen gegen den Tumor gelenkt und die Immunsuppression und Apoptoseresistenz überwunden werden [65-68]. Die Zusammensetzung der TME wird verändert und es kommt neben der Aktivierung der angeborenen Immunantwort, zu einer Induktion einer adaptiven Immunantwort.

Nachfolgend soll deshalb untersucht werden, ob RLR-Liganden sich zur Immuntherapie des Pankreaskarzinoms eignen und die detaillierten Mechanismen betrachtet werden, die zum Therapieerfolg der RLR-Liganden beitragen können.

## 2. Ergebnisse (veröffentlichte Originalarbeiten)

### 2.1 RIG-I-like helicases induce immunogenic cell death of pancreatic cancer cells and sensitize tumors toward killing by CD8<sup>+</sup> T cells

Duewell P, Steger A, Lohr H, Bourhis H, Hoelz H, **Kirchleitner SV**, Stieg MR, Grassmann S, Kobold S, Siveke JT, Endres S, Schnurr M.  
RIG-I-like helicases induce immunogenic cell death of pancreatic cancer cells and sensitize tumors toward killing by CD8<sup>+</sup> T cells.  
*Cell Death and Differentiation* 2014; 21:1825-1837

### 2.2 Targeted activation of melanoma differentiation-associated protein 5 (MDA5) for immunotherapy of pancreatic carcinoma

Duewell P\*, Beller E\*, **Kirchleitner SV**, Adunka T, Bourhis H, Siveke J, Mayr D, Kobold S, Endres S, Schnurr M.  
Targeted activation of melanoma differentiation-associated protein 5 (MDA5) for immunotherapy of pancreatic carcinoma.  
*Oncoimmunology* 2015; 4:e1029698

### 2.3 Immunostimulatory RNA leads to functional reprogramming of myeloid-derived suppressor cells in pancreatic cancer

Metzger P\*, **Kirchleitner SV\***, Kluge M, Koenig LM, Hoerth C, Rambuscheck CA, Boehmer D, Ahlfeld J, Kobold S, Friedel C, Endres S, Schnurr M\*, Duewell P\*.  
Immunostimulatory RNA leads to functional reprogramming of myeloid-derived suppressor cells in pancreatic cancer.  
*Journal for Immunotherapy of Cancer* 2019; 7:288

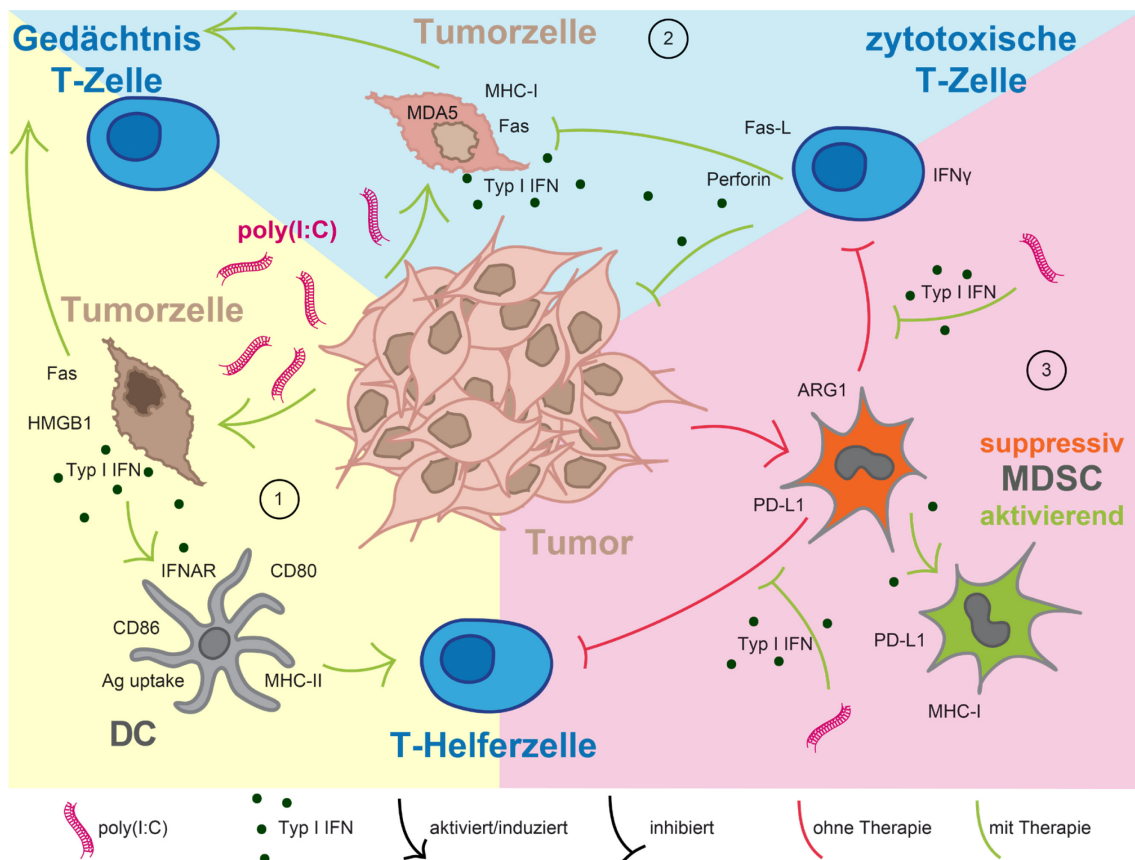
## 2.4 Erklärung zum Eigenanteil

Zur Veröffentlichung “RIG-I-like helicases induce immunogenic cell death of pancreatic cancer cells and sensitize tumors toward killing by CD8+ T cells” [1] habe ich die Mausexperimente und Durchflusszytometrie für Fig. 7e beigetragen. Ebenso war ich an den Mausexperimenten für Fig. 7a-d und Suppl. 1-2 beteiligt.

Für “Targeted activation of melanoma differentiation-associated protein 5 (MDA5) for immunotherapy of pancreatic carcinoma” [2] habe ich die Mausexperimente, ELISA, Durchflusszytometrie und qPCR für Fig. 5 a-c, e, g-h beigetragen. Außerdem habe ich die Mausexperimente für *survival* und *rechallenge* in Fig. 6a, 6c und 6d durchgeführt und ausgewertet. Des Weiteren habe ich den Begutachtern im Reviewprozess Abbildungen mit Daten aus dem KPC-Modell zur Verfügung gestellt, die nicht in die Publikation mitaufgenommen wurden, da sie Teil eines anderen Manuskripts sind.

Alle experimentellen Daten, die in “Immunostimulatory RNA leads to functional reprogramming of myeloid-derived suppressor cells in pancreatic cancer” [3] gezeigt werden, sind von mir generiert. Mit Ausnahme von Fig 3 und Fig 4a-b habe ich auch die jeweilige Analysemethode und Auswertung durchgeführt. Bei Fig 3 und Fig 4a-b waren Michael Kluge und Caroline Friedel für die bioinformatische Auswertung zuständig. Ich habe als erstes Mitglied der Arbeitsgruppe MDSC in den Mittelpunkt meiner Arbeit gestellt und selbstständig die Methodik für Durchflusszytometrie, MDSC-Isolation mittels MACS, Kultivierung und T-zell-Suppressionsassays, mRNA-Aufreinigung aus MDSC und *next generation sequencing* in der Arbeitsgruppe etabliert. Nach zwei kurzzeitigen Mitarbeitern hat Philipp Metzger 2014 das MDSC-Team schließlich dauerhaft verstärkt. Er war an den meisten Mausexperimenten beteiligt, die in die Publikation aufgenommen wurden und hat die erste Version des Manuskriptes geschrieben, weshalb wir uns die Erstautorenschaft teilen. Dies wird auch in seiner Dissertation erläutert [69].

### 3. Zusammenfassung und Diskussion



#### Mechanismen der Immunaktivierung durch RLR-basierte Tumorimmuntherapie:

**[1]** „*RIG-I-like helicases induce immunogenic cell death of pancreatic cancer cells and sensitize tumors toward killing by CD8<sup>+</sup> T cells*“: Poly(I:C)-Therapie führt zu Tumorzelltod, wobei tumorassoziierte Antigene freigesetzt werden, die von DC aufgenommen und präsentiert werden können. Dadurch werden tumorantigenspezifische T-Zellen (CTL) generiert, was langfristig zur Ausbildung eines T-Zell-Gedächtnisses führt. **[2]** „*Targeted activation of melanoma differentiation-associated protein 5 (MDA5) for immunotherapy of pancreatic carcinoma*“: Die Behandlung mit Poly(I:C) macht Tumorzellen empfindlich für einen Fas(CD95)-vermittelten Zelltod. CD8<sup>+</sup> T-Zellen zeigen vermehrte zytolytische Aktivität und sind für den Therapieerfolg von RLR-Liganden mitverantwortlich. **[3]** „*Immunostimulatory RNA leads to functional reprogramming of myeloid-derived suppressor cells in pancreatic cancer*“: MDSC werden vom Tumor rekrutiert und supprimieren T-Zell-Funktion und Proliferation. Die Poly(I:C)-Therapie reprogrammiert suppressive MDSC, was zu einer verbesserten antitumoralen T-Zell-Antwort führt (eigene Abbildung).

### 3.1 Grundlagen der RLR-Therapie

Humane Pankreaskarzinomzellen exprimierten MDA5 und verfügten über eine intakte Signalkaskade [2]. Humane Pankreastumore zeigten immunhistochemisch eine MDA5-Färbung, die invers mit der Differenzierung korreliert war (hohe MDA5-Expression in G2-Tumoren, niedrigere in G3- und G4-Tumoren) [2]. In PDAC-Zelllinien induzierte der synthetische MDA5-Ligand Poly(I:C) IRF3-Phosphorylierung, die Produktion von Typ-I-IFN, eine Hochregulation der MHC-I-Expression und Tumorzelltod, was typische Bestandteile einer antiviralen Immunantwort sind [2]. Ähnliche Effekte waren auch nach der RIG-I-Aktivierung mit ppp-RNA zu beobachten [67], allerdings waren bei Poly(I:C) deutlich geringere RNA-Konzentrationen erforderlich um effektiv Zelltod auszulösen [2, 67]. Poly(I:C)-vermittelte Effekte auf Tumorzellen waren dabei durch MDA5 vermittelt und nicht etwa durch RIG-I oder TLR3 [2]. Die Beteiligung des TLR3-Signalwegs konnte nicht komplett ausgeschlossen werden, auch wenn die ausbleibende Apoptose und IFN-Ausschüttung in Mäusen, die mit nicht komplexiertem Poly(I:C) behandelt wurden, eine tragende Rolle unwahrscheinlich machen [2].

### 3.2 Immunogener Zelltod nach Therapie mit RLR-Liganden

Neben der RLR-vermittelten IFN-Ausschüttung und Aktivierung des angeborenen Immunsystems wurde in Tumorzellen direkt Zelltod ausgelöst, wobei maligne Zellen besonders empfindlich gegenüber dem RLR-vermittelten Zelltod waren [65, 68, 70, 71]. In einer Reihe humaner und muriner PDAC-Zelllinien war der Zelltod auslösbar und es zeigte sich kein Anzeichen für Apoptoseresistenz bei der Behandlung mit MDA5-Liganden [2], wie es beispielsweise bei Chemotherapie oder Bestrahlung der Fall war [66].

In mehreren murinen Pankreaskarzinommodellen zeigte sich eine Poly(I:C)-basierte Therapie gut verträglich und das Überleben der Mäuse wurde verlängert [2]. Dieser Effekt war durch CD8<sup>+</sup> T-Zellen vermittelt, während NK-Zellen nicht notwendig waren [2]. Außerdem bildete sich ein T-Zell-Gedächtnis aus, das therapierte Mäuse bei einer erneuten Tumorzelleexposition schützte [2]. Auch eine Immunisierung mit apoptotischen Tumorzellen, die *in vitro* mit MDA5-Liganden behandelt worden waren, schützte Mäuse bei der anschließenden Implantation von vitalen Tumorzellen vor einem Anwachsen des Tumors [1].

Dies setzt die Ausbildung einer gegen den Tumor gerichteten adaptiven Immunantwort *in vivo* voraus. Demnach erfüllte der hier beschriebene RLR-vermittelte Zelltod die Schlüssel-Kriterien eines immunogenen Zelltods [72].

### 3.3 Tumorzelltod durch zytotoxische T-Zellen

Nach Exposition mit RLR-Liganden wurde bei Tumorzellen MHC-I und Fas (CD95) hochreguliert, was sie empfindlich für einen Fas-vermittelten Zelltod durch zytotoxische T-Zellen (CTL) machte [1]. Es zeigte sich vermehrtes systemisches Auftreten von tumorspezifischen T-Zellen. Zudem exprimierten tumorinfiltrierende CD8<sup>+</sup> T-Zellen vermehrt IFN- $\gamma$ , Fas-Ligand (CD95L) und Perforin, als Ausdruck für gesteigerte zytolytische Aktivität [2]. Folglich konnte eine MDA5-Aktivierung die tumorinduzierte Immunsuppression überwinden und tumorspezifische T-Zellen aktivieren bzw. reaktivieren.

### 3.4 Antigenpräsentation und DC-Aktivierung

Für die effiziente Aktivierung des adaptiven Immunsystems war die Antigenpräsentation durch DC unerlässlich. Pankreaskarzinomzellen, die mit RLR-Liganden behandelt worden waren, führten bei CD8 $\alpha^+$  DC zu Antigenaufnahme und Kreuzpräsentation von tumorassoziiertem Antigen, was sich in einer klonalen Expansion von gegen den Tumor gerichteten T-Zellen widerspiegelte [1]. Tumorzellen, die mit Oxaliplatin oder Staurosporin behandelt worden waren, waren hingegen nicht in der Lage DC zu aktivieren bzw. eine Antigen-Präsentation auf MHC-I auszulösen, obwohl die Zellen effektiv abgetötet wurden [1]. Eine DC-Aktivierung wird durch die Freisetzung von Gefahrensignalen (z. B. *danger-associated molecular patterns*, DAMP) aus den Tumorzellen erreicht [73]. Tumorzellen, die mit RLR-Liganden behandelt worden waren, setzten hohe Mengen an *high mobility-group protein B1* (HMGB1) frei, das über TLR2/4 und RAGE zur DC-Aktivierung führte [74, 75]. Dies trug hier jedoch nicht signifikant zur DC-Aktivierung bei, da diese auch in RAGE<sup>-/-</sup>, MyD88<sup>-/-</sup>, TRIF<sup>-/-</sup>, TLR4<sup>-/-</sup>, oder TLR2<sup>-/-</sup> TLR4<sup>-/-</sup> DC unbeeinträchtigt waren [1]. Ebenso wenig war die DC-Aktivierung das

Resultat eines NLRP3-Inflammasom-Signalings, da die Aktivierung auch in NLRP3<sup>-/-</sup>-, ASC<sup>-/-</sup>-, P2X7<sup>-/-</sup>- oder IL-18<sup>-/-</sup>-DC normal funktionierte [1, 76].

In IFNAR<sup>-/-</sup>-DC andererseits war keine Aktivierung möglich [1]. Sowohl nach intratumoraler als auch nach systemischer Applikation von Poly(I:C) zeigten sich im Tumorgewebe hohe Spiegel von Typ-I und Typ-II-IFN sowie ISGs [1, 2]. In CD8<sup>+</sup>DC wurden MHC-II und kostimulatorische Moleküle hochreguliert [1]. Im Blut fanden sich hohe Spiegel von Typ-I-IFN und die Aktivierung von zirkulierenden DC, T-Zellen, B-Zellen und NK-Zellen [2]. *In vitro* konnte exogen hinzugefügtes IFN weniger DC-Aktivierung verursachen als Medium von RLR-behandelten Tumorzellen [1]. Das vom Tumor stammende Typ-I-IFN war demnach für die DC-Aktivierung entscheidend, wenn auch nicht alleinig verantwortlich.

### 3.5 Rolle der MDSC bei RLR-Therapie

MDSC sind prägender Bestandteil der TME und tragen zur Aufrechterhaltung der Immunsuppression durch den Tumor bei.

In den verwendeten Tumormodellen nahm mit zunehmender Tumorlast auch die Zahl der PMN-MDSC zu [3]. Die hohen Expressionsniveaus von ARG1 und PD-L1, beide mit bekannten T-Zell-Suppressionsmechanismen behaftet [77-80], wiesen auf eine pathologische Aktivierung hin [3]. MDSC konnten die T-Zell-Proliferation inhibieren [3], wobei sich im verwendeten T110299-Modell PMN-MDSC gegenüber M-MDSC als deutlich suppressiver zeigten [3]; ein Phänomen das auch in humanen Studien gezeigt wurde [78, 81-83]. Im direkten Vergleich zu MDSC aus der Milz waren MDSC aus Tumorgewebe zudem deutlich suppressiver [3, 50].

Die RLR-Therapie änderte die Zusammensetzung der Immunzellpopulationen in Tumor und Milz, darunter auch die der MDSC [3, 67]. Die Poly(I:C)-Therapie war in der Lage, die suppressive Kapazität von MDSC zu inhibieren, was mit einer vermehrten Rekrutierung von aktivierten CD8<sup>+</sup> T-Zellen in das Tumorgewebe einher ging [3]. Eine ähnliche Suppressionsreduktion von MDSC konnte für TLR7/8- und TLR9-Aktivierung *in vivo* gezeigt werden [84, 85]. Diese Veränderungen der MDSC-Funktion, die sich



auch auf transkriptioneller Ebene erkennen ließ, waren für den Übergang zu einem pro-immunogenen, T-Zell-angereicherten Tumormilieu charakteristisch [86].

### 3.6 IFN-abhängige Therapieeffekte auf MDSC

Der Therapieerfolg im PDAC war abhängig von CD8<sup>+</sup> T-Zellen [2]. Eine systemische T-Zellaktivierung hing auch von einem intakten *Interferon-alpha-beta receptor* (IFNAR)-Signaling ab [1], was die zentrale Rolle von IFN unterstrich [63, 87]. Auch die Änderung der MDSC-Zusammensetzung und Anzahl war teils IFNAR-vermittelt [3]. MHC-I und PD-L1-Expression auf MDSC wurde durch Poly(I:C)-Behandlung in Wildtyp Mäusen deutlich erhöht, in IFNAR-defizienten Mäusen jedoch nicht [3]. Für PD-L1 wurde bereits gezeigt, dass es durch IFN auf MDSC induzierbar ist [88].

In der Transkriptomanalyse zeigte sich, dass IFN-assoziierte Prozesse einen Großteil der posttherapeutischen Veränderungen in MDSC ausmachten [3]. Es wurde bereits gezeigt, dass IFN in Makrophagen einen M1-Phänotyp induziert und Neutrophile in einen anti-tumor Status repolarisiert [89, 90]. Auch in MDSC gingen IFN-vermittelte Veränderungen im Transkriptom mit einer funktionellen Veränderung einher [3].

Im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen konnte bei tumortragenden IFNAR1<sup>-/-</sup> Mäusen die Suppressivität von MDSC durch Poly(I:C) nicht aufgehoben werden [3]. In IFNAR1<sup>-/-</sup> Mäusen war die IL-6 Freisetzung, trotz intaktem NF-κB Signalwegs, deutlich reduziert [3]. Der ausbleibende Therapieeffekt in IFNAR1<sup>-/-</sup> Mäusen legte eine entscheidende Rolle der IFN-Signalkaskade in der Tumorkontrolle nahe [3]. In Malignom-Patienten wurden niedrige chronische IFN-Level beobachtet, die mit der Etablierung eines immunsuppressiven Milieus in Verbindung gebracht wurden [63]. Bei Patienten mit chronischen Virusinfektionen führte IFN-Signaling zur Anhäufung suppressiver MDSC [91, 92]. Während einer akuten Virusinfektion war IFNAR-Signaling für die Amplifizierung einer frühen proinflammatorischen Zytokinproduktion entscheidend [93].

Der ursächliche Zusammenhang zwischen akutem und chronischem IFN-Signaling, bezogen auf die Entwicklung und Suppressivität von MDSC, ist nicht ausreichend geklärt und erfordert weitere Untersuchung.

### 3.7 Antigenpräsentation durch MDSC

Erfolgreiches T-Zell Priming und Antigenpräsentation sind für die Tumormunität von zentraler Bedeutung.

Für die effiziente Kreuzpräsentation durch DC war Typ-I-IFN erforderlich [94, 95]. Mehrere Gene, die mit Antigenpräsentation zusammenhängen, wurden nach Poly(I:C)-Therapie in MDSC hochreguliert; dennoch konnte keine Kreuzpräsentation von Tumorantigenen beobachtet werden [3]. Anders als in den Studien, die eine Induktion von Antigenpräsentation durch MDSC nach Therapie mit TLR7/8-Agonisten zeigten [85, 96, 97], wurde hier ein optimiertes Isolationsprotokoll verwendet, um eine Kontamination mit professionellen APC, wie DC, zu vermeiden [3].

### 3.8 Ausblick

Zusammenfassend waren RLR-Liganden sowohl geeignet Tumorzelltod von PDAC Zellen auszulösen als auch die tumorinduzierte Immunsuppression zu überkommen, indem die angeborene und die adaptive Immunantwort aktiviert wurden. Die Tumorzellen wurden entweder direkt apoptotisch oder CTL-vermittelt lysiert. Auf beiden Wegen wurden Tumorantigene für DC bereitgestellt und neben dem angeborenen auch das adaptive Immunsystem angeregt. Durch Typ-I-IFN wurde die immunsuppressive Funktion von regulatorischen T-Zellen und MDSC herabgesetzt [84, 98], eine Th1-Polarisierung induziert und Antigenpräsentation durch DC verbessert [99].

Eine effektive Antigenpräsentation von tumorassoziiertem Antigen durch DC bildet die Grundlage für die klinische Anwendung von RLR-Liganden, entweder *ex vivo*, um die Wirksamkeit von Tumorvakzinen auf DC-Basis zu verbessern, oder *in vivo*, um Antitumor-CTL-Antworten direkt zu aktivieren [1]. Dazu kann beispielsweise eine lokale Behandlung von Pankreaskarzinomen mit RLR-Liganden vor der Tumorresektion eine T-Zell-vermittelten Antitumor-Immunantwort induzieren, die möglicherweise das Auswachsen verbleibender Tumorzellen verhindert [1].

Es ist davon auszugehen, dass die Kombination mit RLR-Liganden für einige bisher weniger erfolgreiche Behandlungsstrategien von Vorteil sein kann. Insbesondere Immuntherapien, die auf eine Verbesserung der T-Zell-Funktion abzielen, wie beispielsweise Checkpoint-Inhibitoren oder adaptiver T-Zell-Transfer, können von der Umprogrammierung der TME profitieren.

## 4. Summary and discussion

### 4.1 Principles of RLR therapy in PDAC

Human pancreatic carcinoma cells expressed MDA5 and had an intact signaling cascade [2]. Immunohistochemistry from human tissue samples showed an MDA5 staining in all samples that was inversely correlated with differentiation (lowest MDA5 expression level in G3 and G4 tumors, highest in G2 tumors) [2]. In PDAC cells, the MDA5 ligand Poly(I:C) induced IRF3 phosphorylation, the production of type I IFN, upregulation of MHC-I expression, and tumor cell death as typical components of an antiviral immune response [2]. Similar effects could be observed after RIG-I activation with ppp-RNA [55], but Poly(I:C) required significantly lower RNA concentrations to effectively induce cell death [2, 67]. The effects of Poly(I:C) therapy on tumor cells were mediated by MDA5 and not by RIG-I or TLR3 [2]. The involvement of TLR3 signaling could not be completely ruled out, although the lack of apoptosis and IFN release after treatment with non-complexed Poly(I:C) made a major role unlikely [2].

### 4.2 Immunogenic cell death after therapy with RLR ligands

In addition to RLR-mediated IFN release and activation of the innate immune system, cell death was triggered in tumor cells. Malignant cells appeared to be particularly sensitive to RLR-mediated cell death [65, 68, 70, 71], in a series of human and murine PDAC cell lines treatment with MDA5 ligands elicited cell death and showed no evidence of apoptosis resistance [2], as would be the case with chemotherapy or radiotherapy [66].

In murine pancreatic cancer models Poly(I:C)-based therapy was well tolerated and prolonged the survival of the mice [2]. This effect was mediated by CD8<sup>+</sup> T cells, whereas NK cells were not necessary [2]. In addition, a T cell memory developed that protected treated mice from later tumor cell exposure [2]. Immunization with apoptotic tumor cells treated with MDA5 ligands also protected mice from tumor growth during subsequent implantation of vital cells [1]. This demonstrated the formation of an anti-tumor adaptive immune response *in vivo*.

The described RLR-mediated cell death met key criteria of immunogenic cell death [72].

#### 4.3 Tumor cell death by cytotoxic T cells

Upon exposure to RLR ligands, MHC-I and Fas (CD95) were upregulated in tumor cells, making them susceptible to Fas-mediated cell death by cytotoxic T cells (CTLs) [1]. Increased systemic appearance of tumor-specific T cells were observed. In addition, tumor-infiltrating CD8<sup>+</sup> T cells expressed more IFN- $\gamma$ , Fas ligand (CD95L) and perforin as a sign for increased cytolytic activity [2]. Thus, MDA5 activation could overcome tumor-induced immunosuppression and reactivate tumor-specific T cells.

#### 4.4 Antigen presentation and DC activation

For efficient activation of the adaptive immune system, antigen presentation by DC was essential. Pancreatic carcinoma cells treated with RLR ligands induce antigen uptake and cross-presentation of tumor-associated antigen by CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> DC, which is reflected in a clonal expansion of CTL [1]. On the other hand, oxaliplatin or staurosporine treated tumor cells were unable to induce DC activation or antigenic cross-presentation, although the cells were effectively killed [1]. DC activation is achieved by the release of danger signals (e.g. danger-associated molecular patterns, DAMP) from the tumor cells [73]. Tumor cells treated with RLR ligands released high levels of HMGB1, which can trigger DC activation via TLR2/4 and RAGE [74, 75]. However, this did not seem to contribute significantly to DC activation, as it was also unaffected in RAGE<sup>-/-</sup>, MyD88<sup>-/-</sup>, TRIF<sup>-/-</sup>, TLR4<sup>-/-</sup>, or TLR2<sup>-/-</sup>TLR4<sup>-/-</sup> DC [1]. Nor was DC activation the result of NLRP3 inflammasome signaling because it also worked normally in NLRP3<sup>-/-</sup>, ASC<sup>-/-</sup>, P2X7<sup>-/-</sup> or IL-18<sup>-/-</sup> DC [1, 76].

On the other hand, no activation was observed in IFNAR<sup>-/-</sup> DC [1]. Both after intratumoral and systemic administration of Poly(I:C), tumor tissue displayed high levels of type I and type II IFNs and ISGs [1, 2]. In addition, in CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> DC MHC-II and costimulatory molecules were upregulated [1]. The serum contained high levels of type I IFN and the activation of circulating DC, T cells, B cells and NK cells could be observed [2]. *In vitro*, exogenously added IFN caused less DC activation than medium from RLR-treated tumor cells [1]. The tumor-derived type I IFN was therefore crucial for DC activation, although not solely responsible.

#### 4.5 Role of MDSC in RLR therapy

MDSC are a prominent component of the TME and contribute to the maintenance of tumor immunosuppression.

As the tumor burden increased, so did the number of PMN-MDSC systemically [3]. The high levels of expression of ARG1 and PD-L1, both known T cell suppression mechanisms [77-80], indicated pathological activation [3]. MDSC inhibited T cell proliferation [3] and in the T110299 PDAC model, PMN-MDSC were more suppressive than M-MDSC [3]; a phenomenon known from human studies [78, 81-83]. Tumor tissue MDSC were more suppressive than those derived from the spleen [3, 50].

RLR therapy changed the composition of the immune cell populations in the tumor and spleen, including those of MDSC [3, 67]. The ability of MDSC to suppress T cells was reversed by Poly(I:C), which was accompanied with an increased recruitment of activated CD8<sup>+</sup> T cells into the tumor tissue [3]. A similar reduction of the suppression by MDSC could be demonstrated for TLR7/8 and TLR9 activation *in vivo* [84, 85]. These changes in MDSC function, which could also be seen at the transcriptional level, are characteristic of the transition from a "cold" T cell exclusion to a "hot" T cell enriched tumor milieu [86].

#### 4.6 IFN-dependent therapy effects on MDSC

Therapy success in PDAC was CD8<sup>+</sup> T cell dependent [2]. In turn, systemic T cell activation depended on intact IFNAR signaling [1], underscoring IFN's pivotal role [63, 87]. Also, the change in MDSC composition and number was partially IFNAR mediated [3]. MHC-I and PD-L1 expression on MDSC was significantly increased by Poly(I:C) treatment in wildtype mice, but not in IFNAR-deficient mice [3]. PD-L1 has already been shown to be inducible by IFN on MDSC [88].

Transcriptome analysis revealed that IFN-associated metabolic pathways and signaling pathways account for much of the post-therapeutic changes in MDSC [3]. That IFN induced an M1 phenotype in macrophages and repolarized neutrophils into an

anti-tumor status has already been shown [89, 90]. In MDSC also, IFN-mediated changes in the transcriptome were associated with a functional change [3].

In tumor-bearing IFNAR1<sup>-/-</sup> mice, the general suppression of MDSC was reduced and could not be reversed by Poly(I:C) compared to wildtype mice [3]. In IFNAR1<sup>-/-</sup> mice IL-6 release was significantly reduced, despite intact NF-κB signaling pathway, suggesting a regulatory IFN effect in inflammation [3]. The lack of therapeutic effect in the IFNAR1<sup>-/-</sup> mice suggested a crucial role of IFN signaling in tumor control [3]. In tumor patients, low levels of chronic IFN were associated with the establishment of an immunosuppressive ambience [63] and in patients with chronic viral infections, IFN signaling lead to the accumulation of suppressive MDSC [91, 92]. During an acute viral infection, IFNAR signaling was critical for the amplification of early proinflammatory cytokine production [93].

The causal relationship between acute and chronic IFN signaling, in relation to MDSC development and suppression, is poorly understood and requires further investigation.

#### 4.7 Antigen presentation by MDSC

Successful T cell priming and antigen presentation are of central importance for tumor immunity.

For efficient cross-presentation by DC, type I IFN was required [94, 95]. Several genes associated with antigen presentation were upregulated after Poly(I:C) therapy in MDSC, yet no cross-presentation of tumor antigens could be achieved [3]. Unlike the studies showing induction of cross-presentation by MDSC after treatment with TLR7/8 agonists [85, 96, 97], an optimized isolation protocol was used to avoid contamination with professional APC such as DC [3].

#### 4.8 Outlook

In summary, RLR ligands are both capable of inducing tumor cell death of PDAC cells and overcoming tumor-induced immunosuppression by activating innate and adaptive immune responses. The tumor cells became either directly apoptotic or were CTL-mediated lysed. In both ways, tumor antigens were provided for DC and in addition to the innate, the adaptive immune system was also stimulated. Type I IFN decreased the immunosuppressive function of regulatory T cells and MDSC [84, 98], induced Th1 polarization and facilitates antigen presentation by DC [99].

Efficient cross-presentation of tumor-associated antigen by DC builds the foundation for the clinical application of RLR ligands: *ex vivo* to enhance the efficacy of DC-based tumor vaccines, or to immediately induce anti-tumor T cell response *in vivo* [1]. Therefore, local treatment of pancreatic carcinomas with RLR ligands prior to tumor resection may induce a T cell-mediated anti-tumor immune response with the potential to prevent the residual tumor cells from outgrowing [1].

It is expected, that combinations with RLR ligands may be beneficial for some previously less successful treatment strategies. Immunotherapies aiming at improving T cell function, such as checkpoint inhibitors or adaptive T cell transfer, may benefit in particular from the reprogramming of the TME.



## 5. Literaturverzeichnis

1. Duewell P, Steger A, Lohr H, Bourhis H, Hoelz H, Kirchleitner SV, et al., Schnurr M. RIG-I-like helicases induce immunogenic cell death of pancreatic cancer cells and sensitize tumors toward killing by CD8(+) T cells. *Cell Death and Differentiation* 2014; 21:1825-1837
2. Duewell P, Beller E, Kirchleitner SV, Adunka T, Bourhis H, Siveke J, et al., Schnurr M. Targeted activation of melanoma differentiation-associated protein 5 (MDA5) for immunotherapy of pancreatic carcinoma. *Oncoimmunology* 2015; 4:e1029698
3. Metzger P, Kirchleitner SV, Kluge M, Koenig LM, Hoerth C, Rambuscheck CA, et al., Duewell P. Immunostimulatory RNA leads to functional reprogramming of myeloid-derived suppressor cells in pancreatic cancer. *Journal for Immunotherapy of Cancer* 2019: in press
4. Sharma P, Allison JP. The future of immune checkpoint therapy. *Science* 2015; 348:56-61
5. Yu Y. Molecular classification and precision therapy of cancer: immune checkpoint inhibitors. *Frontiers of Medicine* 2018; 12:229-235
6. Neoptolemos JP, Kleeff J, Michl P, Costello E, Greenhalf W, Palmer DH. Therapeutic developments in pancreatic cancer: current and future perspectives. *Nature Reviews: Gastroenterology & Hepatology* 2018; 15:333-348
7. Teague A, Lim KH, Wang-Gillam A. Advanced pancreatic adenocarcinoma: a review of current treatment strategies and developing therapies. *Therapeutic Advances in Medical Oncology* 2015; 7:68-84
8. Von Hoff DD, Ervin T, Arena FP, Chiorean EG, Infante J, Moore M, et al., Renschler MF. Increased survival in pancreatic cancer with nab-paclitaxel plus gemcitabine. *New England Journal of Medicine* 2013; 369:1691-1703
9. Conroy T, Desseigne F, Ychou M, Bouche O, Guimbaud R, Becouarn Y, et al., Intergroup P. FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer. *New England Journal of Medicine* 2011; 364:1817-1825
10. Philip PA, Benedetti J, Corless CL, Wong R, O'Reilly EM, Flynn PJ, et al., Blanke CD. Phase III study comparing gemcitabine plus cetuximab versus gemcitabine in patients with advanced pancreatic adenocarcinoma: Southwest Oncology Group-directed intergroup trial S0205. *Journal of Clinical Oncology* 2010; 28:3605-3610
11. Kindler HL, Ioka T, Richel DJ, Bennouna J, Letourneau R, Okusaka T, et al., Van Cutsem E.

- Axitinib plus gemcitabine versus placebo plus gemcitabine in patients with advanced pancreatic adenocarcinoma: a double-blind randomised phase 3 study.  
*Lancet Oncology* 2011; 12:256-262
12. Rougier P, Riess H, Manges R, Karasek P, Humblet Y, Barone C, et al., Philip PA. Randomised, placebo-controlled, double-blind, parallel-group phase III study evaluating aflibercept in patients receiving first-line treatment with gemcitabine for metastatic pancreatic cancer.  
*European Journal of Cancer* 2013; 49:2633-2642
13. Van Cutsem E, Vervenne WL, Bennouna J, Humblet Y, Gill S, Van Laethem JL, et al., Moore MJ. Phase III trial of bevacizumab in combination with gemcitabine and erlotinib in patients with metastatic pancreatic cancer.  
*Journal of Clinical Oncology* 2009; 27:2231-2237
14. Bramhall SR, Schulz J, Nemunaitis J, Brown PD, Baillet M, Buckels JA. A double-blind placebo-controlled, randomised study comparing gemcitabine and marimastat with gemcitabine and placebo as first line therapy in patients with advanced pancreatic cancer.  
*British Journal of Cancer* 2002; 87:161-167
15. Hingorani SR, Harris WP, Beck JT, Berdov BA, Wagner SA, Pshevlotsky EM, et al., Devoe CE. Phase Ib study of PEGylated recombinant human hyaluronidase and gemcitabine in patients with advanced pancreatic cancer.  
*Clinical Cancer Research* 2016; 22:2848-2854
16. Infante JR, Somer BG, Park JO, Li CP, Scheulen ME, Kasubhai SM, et al., Le N. A randomised, double-blind, placebo-controlled trial of trametinib, an oral MEK inhibitor, in combination with gemcitabine for patients with untreated metastatic adenocarcinoma of the pancreas.  
*European Journal of Cancer* 2014; 50:2072-2081
17. O'Neil BH, Scott AJ, Ma WW, Cohen SJ, Leichman L, Aisner DL, et al., Messersmith WA. A phase II/III randomized study to compare the efficacy and safety of rigosertib plus gemcitabine versus gemcitabine alone in patients with previously untreated metastatic pancreatic cancer.  
*Annals of Oncology* 2015; 26:2505
18. Adamska A, Domenichini A, Falasca M. Pancreatic ductal adenocarcinoma: current and evolving therapies.  
*International Journal of Molecular Sciences* 2017; 18
19. Moore MJ, Goldstein D, Hamm J, Figer A, Hecht JR, Gallinger S, et al., Parulekar W. Erlotinib plus gemcitabine compared with gemcitabine alone in patients with advanced pancreatic cancer: a phase III trial of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group.  
*Journal of Clinical Oncology* 2007; 25:1960-1966
20. Young K, Hughes DJ, Cunningham D, Starling N. Immunotherapy and pancreatic cancer: unique challenges and potential opportunities.  
*Therapeutic Advances in Medical Oncology* 2018; 10:1758835918816281
21. Rosenberg A, Mahalingam D. Immunotherapy in pancreatic adenocarcinoma-overcoming barriers to response.  
*Journal of Gastrointestinal Oncology* 2018; 9:143-159

22. Seo YD, Pillarisetty VG.  
T-cell programming in pancreatic adenocarcinoma: a review.  
*Cancer Gene Therapy* 2017; 24:106-113
23. Le DT, Durham JN, Smith KN, Wang H, Bartlett BR, Aulakh LK, et al., Diaz LA, Jr.  
Mismatch repair deficiency predicts response of solid tumors to PD-1 blockade.  
*Science* 2017; 357:409-413
24. Weiss GJ, Waypa J, Blaydorn L, Coats J, McGahey K, Sangal A, et al., Khemka V.  
A phase Ib study of pembrolizumab plus chemotherapy in patients with advanced cancer (PembroPlus).  
*British Journal of Cancer* 2017; 117:33-40
25. Hardacre JM, Mulcahy M, Small W, Talamonti M, Obel J, Krishnamurthi S, et al., Chiorean EG.  
Addition of algenpantucel-L immunotherapy to standard adjuvant therapy for pancreatic cancer: a phase 2 study.  
*Journal of Gastrointestinal Surgery* 2013; 17:94-100; discussion p. 100-101
26. Middleton G, Silcocks P, Cox T, Valle J, Wadsley J, Propper D, et al., Neoptolemos J.  
Gemcitabine and capecitabine with or without telomerase peptide vaccine GV1001 in patients with locally advanced or metastatic pancreatic cancer (TeloVac): an open-label, randomised, phase 3 trial.  
*Lancet Oncology* 2014; 15:829-840
27. Wang-Gillam A, Picozzi V, Crocenzi T, Morse M, Zeh H, Fine R, et al., Le D.  
A Phase IIb, randomized, multicenter study of the efficacy of GVAX pancreas vaccine and CRS-207 compared to chemotherapy or to CRS-207 alone in adults with previously-treated metastatic pancreatic adenocarcinoma (eclipse study).  
*Journal for Immunotherapy of Cancer* 2014; 2:P68-P68
28. Parente P, Parcesepe P, Covelli C, Olivieri N, Remo A, Pancione M, et al., Giordano G.  
Crosstalk between the tumor microenvironment and immune system in pancreatic ductal adenocarcinoma: potential targets for new therapeutic approaches.  
*Gastroenterology Research and Practice* 2018; 2018:7530619
29. Stromnes IM, Hulbert A, Pierce RH, Greenberg PD, Hingorani SR.  
T-cell localization, activation, and clonal expansion in human pancreatic ductal adenocarcinoma.  
*Cancer Immunology Research* 2017; 5:978-991
30. Gabitass RF, Annels NE, Stocken DD, Pandha HA, Middleton GW.  
Elevated myeloid-derived suppressor cells in pancreatic, esophageal and gastric cancer are an independent prognostic factor and are associated with significant elevation of the Th2 cytokine interleukin-13.  
*Cancer Immunology Immunotherapy* 2011; 60:1419-1430
31. Hiraoka N, Onozato K, Kosuge T, Hirohashi S.  
Prevalence of FOXP3+ regulatory T cells increases during the progression of pancreatic ductal adenocarcinoma and its premalignant lesions.  
*Clinical Cancer Research* 2006; 12:5423-5434
32. Sanford DE, Porembka MR, Panni RZ, Mitchem JB, Belt BA, Plambeck-Suess SM, et al., Linehan DC.  
A study of zoledronic acid as neo-adjuvant, perioperative therapy in patients with resectable pancreatic ductal adenocarcinoma.  
*Journal of Cancer Therapy* 2013; 4:797-803

33. Nywening TM, Wang-Gillam A, Sanford DE, Belt BA, Panni RZ, Cusworth BM, et al., Linehan DC.  
Targeting tumour-associated macrophages with CCR2 inhibition in combination with FOLFIRINOX in patients with borderline resectable and locally advanced pancreatic cancer: a single-centre, open-label, dose-finding, non-randomised, phase 1b trial.  
*Lancet Oncology* 2016; 17:651-662
34. Noel M, O'Reilly EM, Wolpin BM, Ryan DP, Bullock AJ, Britten CD, et al., Lowery MA.  
Phase 1b study of a small molecule antagonist of human chemokine (C-C motif) receptor 2 (PF-04136309) in combination with nab-paclitaxel/gemcitabine in first-line treatment of metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma.  
*Investigational New Drugs* 2019;
35. Hingorani SR, Wang L, Multani AS, Combs C, Deramaudt TB, Hruban RH, et al., Tuveson DA.  
Trp53R172H and KrasG12D cooperate to promote chromosomal instability and widely metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma in mice.  
*Cancer Cell* 2005; 7:469-483
36. Courtin A, Richards FM, Bapiro TE, Bramhall JL, Neesse A, Cook N, et al., Jodrell DI.  
Anti-tumour efficacy of capecitabine in a genetically engineered mouse model of pancreatic cancer.  
*PloS One* 2013; 8:e67330
37. Olive KP, Jacobetz MA, Davidson CJ, Gopinathan A, McIntyre D, Honess D, et al., Tuveson DA.  
Inhibition of hedgehog signaling enhances delivery of chemotherapy in a mouse model of pancreatic cancer.  
*Science* 2009; 324:1457-1461
38. Gabrilovich DI, Bronte V, Chen SH, Colombo MP, Ochoa A, Ostrand-Rosenberg S, Schreiber H.  
The terminology issue for myeloid-derived suppressor cells.  
*Cancer Research* 2007; 67:425; author reply 426
39. Marigo I, Bosio E, Solito S, Mesa C, Fernandez A, Dolcetti L, et al., Bronte V.  
Tumor-induced tolerance and immune suppression depend on the C/EBPbeta transcription factor.  
*Immunity* 2010; 32:790-802
40. Peranzoni E, Zilio S, Marigo I, Dolcetti L, Zanovello P, Mandruzzato S, Bronte V.  
Myeloid-derived suppressor cell heterogeneity and subset definition.  
*Current Opinion in Immunology* 2010; 22:238-244
41. Gentles AJ, Newman AM, Liu CL, Bratman SV, Feng W, Kim D, et al., Alizadeh AA.  
The prognostic landscape of genes and infiltrating immune cells across human cancers.  
*Nature Medicine* 2015; 21:938-945
42. Mowbray NG, Griffith D, Hammada M, Shingler G, Kambal A, Al-Sarireh B.  
A meta-analysis of the utility of the neutrophil-to-lymphocyte ratio in predicting survival after pancreatic cancer resection.  
*HPB* 2018; 20:379-384
43. Bayne LJ, Beatty GL, Jhala N, Clark CE, Rhim AD, Stanger BZ, Vonderheide RH.

- Tumor-derived granulocyte-macrophage colony-stimulating factor regulates myeloid inflammation and T cell immunity in pancreatic cancer.  
*Cancer Cell* 2012; 21:822-835
44. Gordon S, Martinez FO.  
Alternative activation of macrophages: mechanism and functions.  
*Immunity* 2010; 32:593-604
45. Condamine T, Mastio J, Gabrilovich DI.  
Transcriptional regulation of myeloid-derived suppressor cells.  
*Journal of Leukocyte Biology* 2015; 98:913-922
46. Park MJ, Lee SH, Kim EK, Lee EJ, Baek JA, Park SH, et al., Cho ML.  
Interleukin-10 produced by myeloid-derived suppressor cells is critical for the induction of Tregs and attenuation of rheumatoid inflammation in mice.  
*Scientific Reports* 2018; 8:3753
47. Gabrilovich DI, Nagaraj S.  
Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system.  
*Nature Reviews: Immunology* 2009; 9:162-174
48. Mondanelli G, Ugel S, Grohmann U, Bronte V.  
The immune regulation in cancer by the amino acid metabolizing enzymes ARG and IDO.  
*Current Opinion in Pharmacology* 2017; 35:30-39
49. Noman MZ, Desantis G, Janji B, Hasmim M, Karray S, Dessen P, et al., Chouaib S.  
PD-L1 is a novel direct target of HIF-1 $\alpha$ , and its blockade under hypoxia enhanced MDSC-mediated T cell activation.  
*Journal of Experimental Medicine* 2014; 211:781-790
50. Kumar V, Patel S, Tcyganov E, Gabrilovich DI.  
The nature of myeloid-derived suppressor cells in the tumor microenvironment.  
*Trends in Immunology* 2016; 37:208-220
51. Anani W, Shurin MR.  
Targeting myeloid-derived suppressor cells in cancer.  
*Advances in Experimental Medicine and Biology* 2017; 1036:105-128
52. Vincent J, Mignot G, Chalmin F, Ladoire S, Bruchard M, Chevriaux A, et al., Ghiringhelli F.  
5-Fluorouracil selectively kills tumor-associated myeloid-derived suppressor cells resulting in enhanced T cell-dependent antitumor immunity.  
*Cancer Research* 2010; 70:3052-3061
53. Pichlmair A, Schulz O, Tan CP, Naslund TI, Liljestrom P, Weber F, Reis e Sousa C.  
RIG-I-mediated antiviral responses to single-stranded RNA bearing 5'-phosphates.  
*Science* 2006; 314:997-1001
54. Satoh T, Takeuchi O, Vandenbon A, Yasuda K, Tanaka Y, Kumagai Y, et al., Akira S.  
The Jmjd3-Irf4 axis regulates M2 macrophage polarization and host responses against helminth infection.  
*Nature Immunology* 2010; 11:936-944
55. de la Torre AN, Contractor S, Castaneda I, Cathcart CS, Razdan D, Klyde D, et al., Salazar AM.  
A Phase I trial using local regional treatment, nonlethal irradiation, intratumoral and systemic polyinosinic-polycytidylic acid polylysine carboxymethylcellulose to treat liver cancer: in search of the abscopal effect.

- Journal of Hepatocellular Carcinoma* 2017; 4:111-121
56. Kato H, Takeuchi O, Sato S, Yoneyama M, Yamamoto M, Matsui K, et al., Akira S. Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. *Nature* 2006; 441:101-105
57. Loo YM, Gale M, Jr. Immune signaling by RIG-I-like receptors. *Immunity* 2011; 34:680-692
58. Yoneyama M, Kikuchi M, Matsumoto K, Imaizumi T, Miyagishi M, Taira K, et al., Fujita T. Shared and unique functions of the DExD/H-box helicases RIG-I, MDA5, and LGP2 in antiviral innate immunity. *Journal of Immunology* 2005; 175:2851-2858
59. Musella M, Manic G, De Maria R, Vitale I, Sistigu A. Type-I-interferons in infection and cancer: Unanticipated dynamics with therapeutic implications. *Oncoimmunology* 2017; 6:e1314424
60. Reikine S, Nguyen JB, Modis Y. Pattern recognition and signaling mechanisms of RIG-I and MDA5. *Frontiers in Immunology* 2014; 5:342
61. Dunn IS, Haggerty TJ, Kono M, Durda PJ, Butera D, Macdonald DB, et al., Kurnick JT. Enhancement of human melanoma antigen expression by IFN-beta. *Journal of Immunology* 2007; 179:2134-2142
62. Xiao W, Klement JD, Lu C, Ibrahim ML, Liu K. IFNAR1 controls autocrine type I IFN regulation of PD-L1 expression in myeloid-derived suppressor cells. *Journal of Immunology* 2018; 201:264-277
63. Snell LM, McGaha TL, Brooks DG. Type I interferon in chronic virus infection and cancer. *Trends in Immunology* 2017; 38:542-557
64. Zhu Y, Karakhanova S, Huang X, Deng SP, Werner J, Bazhin AV. Influence of interferon-alpha on the expression of the cancer stem cell markers in pancreatic carcinoma cells. *Experimental Cell Research* 2014; 324:146-156
65. Besch R, Poeck H, Hohenauer T, Senft D, Hacker G, Berking C, et al., Hartmann G. Proapoptotic signaling induced by RIG-I and MDA-5 results in type I interferon-independent apoptosis in human melanoma cells. *Journal of Clinical Investigation* 2009; 119:2399-2411
66. Tormo D, Checinska A, Alonso-Curbelo D, Perez-Guijarro E, Canon E, Riveiro-Falkenbach E, et al., Soengas MS. Targeted activation of innate immunity for therapeutic induction of autophagy and apoptosis in melanoma cells. *Cancer Cell* 2009; 16:103-114
67. Ellermeier J, Wei J, Duewell P, Hoves S, Stieg MR, Adunka T, et al., Schnurr M. Therapeutic efficacy of bifunctional siRNA combining TGF-beta1 silencing with RIG-I activation in pancreatic cancer. *Cancer Research* 2013; 73:1709-1720

68. Poeck H, Besch R, Maihoefer C, Renn M, Tormo D, Morskaya SS, et al., Hartmann G.  
5'-Triphosphate-siRNA: turning gene silencing and Rig-I activation against melanoma.  
*Nature Medicine* 2008; 14:1256-1263
69. Metzger P.  
Myeloid-derived suppressor cells (MDSC) in murine pancreatic cancer: Role of IRF4 in development and function of MDSC in RIG-I-like helicase-based immunotherapy.  
*Dissertation, LMU München*, 2019; (URN: urn:nbn:de:bvb:19-244658)
70. Bhoopathi P, Quinn BA, Gui Q, Shen XN, Grossman SR, Das SK, et al., Emdad L.  
Pancreatic cancer-specific cell death induced in vivo by cytoplasmic-delivered polyinosine-polycytidylic acid.  
*Cancer Research* 2014; 74:6224-6235
71. Meng G, Xia M, Xu C, Yuan D, Schnurr M, Wei J.  
Multifunctional antitumor molecule 5'-triphosphate siRNA combining glutaminase silencing and RIG-I activation.  
*International Journal of Cancer* 2014; 134:1958-1971
72. Kroemer G, Galluzzi L, Kepp O, Zitvogel L.  
Immunogenic cell death in cancer therapy.  
*Annual Review of Immunology* 2013; 31:51-72
73. Rock K, Grandoch M, Majora M, Krutmann J, Fischer JW.  
Collagen fragments inhibit hyaluronan synthesis in skin fibroblasts in response to ultraviolet B (UVB): new insights into mechanisms of matrix remodeling.  
*Journal of Biological Chemistry* 2011; 286:18268-18276
74. Apetoh L, Ghiringhelli F, Tesniere A, Obeid M, Ortiz C, Criollo A, et al., Zitvogel L.  
Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy.  
*Nature Medicine* 2007; 13:1050-1059
75. Curtin JF, Liu N, Candolfi M, Xiong W, Assi H, Yagiz K, et al., Castro MG.  
HMGB1 mediates endogenous TLR2 activation and brain tumor regression.  
*PLoS Medicine* 2009; 6:e10
76. Ghiringhelli F, Apetoh L, Tesniere A, Aymeric L, Ma Y, Ortiz C, et al., Zitvogel L.  
Activation of the NLRP3 inflammasome in dendritic cells induces IL-1beta-dependent adaptive immunity against tumors.  
*Nature Medicine* 2009; 15:1170-1178
77. Bronte V, Serafini P, De Santo C, Marigo I, Tosello V, Mazzoni A, et al., Zanovello P.  
IL-4-induced arginase 1 suppresses alloreactive T cells in tumor-bearing mice.  
*Journal of Immunology* 2003; 170:270-278
78. Lang S, Bruderek K, Kaspar C, Hoing B, Kanaan O, Dominas N, et al., Brandau S.  
Clinical relevance and suppressive capacity of human myeloid-derived suppressor cell subsets.  
*Clinical Cancer Research* 2018; 24:4834-4844
79. Rodriguez PC, Ernstoff MS, Hernandez C, Atkins M, Zabaleta J, Sierra R, Ochoa AC.  
Arginase I-producing myeloid-derived suppressor cells in renal cell carcinoma are a subpopulation of activated granulocytes.  
*Cancer Research* 2009; 69:1553-1560

80. Youn JI, Collazo M, Shalova IN, Biswas SK, Gabrilovich DI.  
Characterization of the nature of granulocytic myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice.  
*Journal of Leukocyte Biology* 2012; 91:167-181
81. Bronte V, Brandau S, Chen SH, Colombo MP, Frey AB, Greten TF, et al., Gabrilovich DI.  
Recommendations for myeloid-derived suppressor cell nomenclature and characterization standards.  
*Nature Communications* 2016; 7:12150
82. Khaled YS, Ammori BJ, Elkord E.  
Increased levels of granulocytic myeloid-derived suppressor cells in peripheral blood and tumour tissue of pancreatic cancer patients.  
*Journal of Immunology Research* 2014; 2014:879897
83. Pergamo M, Miller G.  
Myeloid-derived suppressor cells and their role in pancreatic cancer.  
*Cancer Gene Therapy* 2017; 24:100-105
84. Zoglmeier C, Bauer H, Noerenberg D, Wedekind G, Bittner P, Sandholzer N, et al., Bourquin C.  
CpG blocks immunosuppression by myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice.  
*Clinical Cancer Research* 2011; 17:1765-1775
85. Spinetti T, Spagnuolo L, Mottas I, Secondini C, Treinies M, Ruegg C, et al., Bourquin C.  
TLR7-based cancer immunotherapy decreases intratumoral myeloid-derived suppressor cells and blocks their immunosuppressive function.  
*Oncoimmunology* 2016; 5:e1230578
86. Binnewies M, Roberts EW, Kersten K, Chan V, Fearon DF, Merad M, et al., Krummel MF.  
Understanding the tumor immune microenvironment (TIME) for effective therapy.  
*Nature Medicine* 2018; 24:541-550
87. Bald T, Landsberg J, Lopez-Ramos D, Renn M, Glodde N, Jansen P, et al., Tuting T.  
Immune cell-poor melanomas benefit from PD-1 blockade after targeted type I IFN activation.  
*Cancer Discovery* 2014; 4:674-687
88. Bazhin AV, von Ahn K, Fritz J, Werner J, Karakhanova S.  
Interferon-alpha up-regulates the expression of PD-L1 molecules on immune cells through STAT3 and p38 signaling.  
*Frontiers in Immunology* 2018; 9:2129
89. Andzinski L, Kasnitz N, Stahnke S, Wu CF, Gereke M, von Kockritz-Blickwede M, et al., Jablonska J.  
Type I IFNs induce anti-tumor polarization of tumor associated neutrophils in mice and human.  
*International Journal of Cancer* 2016; 138:1982-1993
90. Sang Y, Miller LC, Blecha F.  
Macrophage polarization in virus-host interactions.  
*Journal of Clinical & Cellular Immunology* 2015; 6
91. Taleb K, Auffray C, Villefroy P, Pereira A, Hosmalin A, Gaudry M, Le Bon A.



- Chronic type I IFN is sufficient to promote immunosuppression through accumulation of myeloid-derived suppressor cells.  
*Journal of Immunology* 2017; 198:1156-1163
92. Norris BA, Uebelhoer LS, Nakaya HI, Price AA, Grakoui A, Pulendran B. Chronic but not acute virus infection induces sustained expansion of myeloid suppressor cell numbers that inhibit viral-specific T cell immunity.  
*Immunity* 2013; 38:309-321
93. Goritzka M, Durant LR, Pereira C, Salek-Ardakani S, Openshaw PJ, Johansson C. Alpha/beta interferon receptor signaling amplifies early proinflammatory cytokine production in the lung during respiratory syncytial virus infection.  
*Journal of Virology* 2014; 88:6128-6136
94. Diamond MS, Kinder M, Matsushita H, Mashayekhi M, Dunn GP, Archambault JM, et al., Schreiber RD. Type I interferon is selectively required by dendritic cells for immune rejection of tumors.  
*Journal of Experimental Medicine* 2011; 208:1989-2003
95. Fuertes MB, Kacha AK, Kline J, Woo SR, Kranz DM, Murphy KM, Gajewski TF. Host type I IFN signals are required for antitumor CD8<sup>+</sup> T cell responses through CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> dendritic cells.  
*Journal of Experimental Medicine* 2011; 208:2005-2016
96. Kerkar SP, Goldszmid RS, Muranski P, Chinnasamy D, Yu Z, Reger RN, et al., Restifo NP. IL-12 triggers a programmatic change in dysfunctional myeloid-derived cells within mouse tumors.  
*Journal of Clinical Investigation* 2011; 121:4746-4757
97. Manjili MH. Phenotypic plasticity of MDSC in cancers.  
*Immunological Investigations* 2012; 41:711-721
98. Pace L, Vitale S, Dettori B, Palombi C, La Sorsa V, Belardelli F, et al., Doria G. APC activation by IFN-alpha decreases regulatory T cell and enhances Th cell functions.  
*Journal of Immunology* 2010; 184:5969-5979
99. van den Boorn JG, Hartmann G. Turning tumors into vaccines: co-opting the innate immune system.  
*Immunity* 2013; 39:27-37

## 6. Verzeichnis der Abkürzungen

APC	<i>Antigen-presenting cell</i>
ARG1	<i>Arginase 1</i>
ASC	<i>Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CTL	<i>Cytotoxic T lymphocyte</i>
CTLA4	<i>Cytotoxic T lymphocyte-associated protein 4</i>
CXCL	<i>CXC-chemokine ligand</i>
DC	<i>Dendritic cell</i>
dsRNA	<i>Double-stranded RNA</i>
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
G-CSF	<i>Granulocyte colony-stimulating factor</i>
GM-CSF	<i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
HMGB1	<i>High-mobility-group-protein B1</i>
IDO1	<i>Indoleamine 2,3-dioxygenase 1</i>
IFN	<i>Interferon</i>
IFNAR	<i>Interferon-alpha-beta receptor</i>
IL	<i>Interleukin</i>
iNOS	<i>Inducible nitric oxide synthases</i>
IRF3	<i>IFN regulatory factor 3</i>
IRF7	<i>IFN regulatory factor 7</i>
ISG	<i>Interferon-stimulated genes</i>
KRAS	<i>Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
Ly6C	<i>Lymphocyte antigen 6 complex, locus C</i>
Ly6G	<i>Lymphocyte antigen 6 complex, locus G</i>
MAVS	<i>Mitochondrial antiviral-signaling protein</i>
MDA5	<i>Melanoma differentiation-associated antigen 5</i>
MDSC	<i>Myeloid-derived suppressor cells</i>
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
M-MDSC	<i>Monocytic myeloid-derived suppressor cells</i>
moDC	<i>Monocyte-derived DC</i>
Myd88	<i>Myeloid differentiation primary response 88</i>
NF- $\kappa$ B	<i>Nuclear factor kappa B</i>
NK	<i>Natural killer cell</i>
NLRP3	<i>NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 3</i>

---

NOS	<i>Nitrogen species</i>
NOX	<i>Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase</i>
P2x7	<i>Purinergic receptor P2X 7</i>
PD-1	<i>Programmed cell death protein 1</i>
PDAC	<i>Pancreatic ductal adenocarcinoma</i>
PD-L1	<i>Programmed cell death 1 ligand 1</i>
PMN-MDSC	<i>Polymorphonuclear MDSC</i>
Poly(I:C)	<i>Polyinosinic:polycytidylic acid</i>
RIG-I	<i>Retinoic acid-inducible gene I</i>
RLR	<i>RIG-I-like receptor</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
ROS	<i>Reactive oxygen</i>
STAT	<i>Signal transducer and activator of transcription</i>
T110299	<i>PDAC Zelllinie</i>
TAM	<i>Tumor-associated macrophages</i>
TGF- $\beta$	<i>Transforming growth factor <math>\beta</math></i>
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TME	<i>Tumor microenvironment</i>
TNF- $\alpha$	<i>Tumor necrosis factor-<math>\alpha</math></i>
TRIF	<i>TIR domain-containing adapter inducing IFN-<math>\beta</math></i>

## 7. Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Prof. Max Schnurr und PD Peter Düwell für die Chance bedanken in einer kollegialen Arbeitsgruppe ein interessantes Thema bearbeiten und weiterentwickeln zu dürfen und in einer freundschaftlichen Atmosphäre Wissenschaft zu erlernen. Prof. Stefan Endres gebührt großer Dank dafür, in der Klin-Pharm eine angenehme, produktive, medizinstudentenfreundliche Arbeitsumgebung kreiert zu haben, sowie für die Bereitschaft in jeder Lebenslage Unterstützung anzubieten.

Ich danke PD Dr. Michael Hristov (Institut für Prophylaxe und Epidemiologie der Kreislaufkrankheiten, Poliklinik, Klinikum der Universität München) für die Durchführung und Optimierung des FACSoring von MDSC, Dr. Meino Rohlf's (Kinderklinik und Kinderpoliklinik, Klinikum der Universität München) für seine Unterstützung beim Next-Generation-Sequenzierung und Michael Kluge und Prof. Caroline Friedel (Institut für Informatik, Ludwig-Maximilians-Universität München) für die Unterstützung bei der bioinformatischen Auswertung.

Stellvertretend für alle Versuchstiere, die in der medizinischen Forschung ihr Leben im Dienste der Wissenschaft verlieren, will ich die Gelegenheit nutzen mich an „Kein-Ohr-Maus“ zu erinnern, die keine Gelegenheit für einen Kampf ausgelassen hat.

Bei Dr. Hannes Hölz und Dr. Tina Adunka möchte ich mich für die Einarbeitung und Einführung in die Methodik bedanken, bei Bruno Cadilha weil er immer für jeden da ist, bei Daniel Böhmer und Dr. Lars König für die lebhaften Diskussionen und Dr. Florian Neff für die gute Zusammenarbeit an der TUM. Philipp Metzger war mir immer ein großartiger Laborkollege und Partner im MDSC-Team.

Für die Bereitstellung von geeigneten Räumlichkeiten zum Konferieren, BrainStormen und Schlachtplanentwickeln sowie den steten Nachschub an flüssiger Motivation, Trost und Ehrlichkeit hat das Corleone zuverlässig gesorgt.

Außerdem möchte ich allen Klin-Pharm-Kollegen für die Momente, die unsere gemeinsame Laborzeit nicht nur erträglich, sondern besonders und prägend gemacht haben, einen herzlichen Dank aussprechen.

Der finanziellen Unterstützung durch das Mildred-Scheel-Doktorandenprogramm der Deutschen Krebshilfe und das Förderprogramm für Forschung und Lehre (FöFoLe) der LMU verdanke ich die Möglichkeit während meines Studiums eine wissenschaftliche Arbeit durchzuführen.

Ein ganz besonderer Dank gebührt meiner Familie, die mich zu jeder Zeit voll unterstützt hat. Danke Walter, Oma, Dorle, Diddi und Mama!

## 8.2 Publikationen

### 8.2.1 Originalarbeiten

1. Duewell P, Steger A, Lohr H, Bourhis H, Hoelz H, **Kirchleitner SV**, Stieg MR, Grassmann S, Kobold S, Siveke JT, Endres S, Schnurr M.  
RIG-I-like helicases induce immunogenic cell death of pancreatic cancer cells and sensitize tumors toward killing by CD8<sup>+</sup> T cells.  
*Cell Death and Differentiation* 2014; 21:1825-1837.  
JIF 8,4
2. Duewell P\*, Beller E\*, **Kirchleitner SV**, Adunka T, Bourhis H, Siveke J, Mayr D, Kobold S, Endres S, Schnurr M.  
Targeted activation of melanoma differentiation-associated protein 5 (MDA5) for immunotherapy of pancreatic carcinoma.  
*Oncoimmunology* 2015; 4:e1029698.  
JIF 6,3
3. Metzger P, **Kirchleitner SV**, Koenig LM, Horth C, Kobold S, Endres S, Schnurr M, Duewell P.  
Dying cells expose a nuclear antigen cross-reacting with anti-PD-1 monoclonal antibodies.  
*Scientific Reports* 2018; 8:8810.  
JIF 4,1
4. Metzger P\*, **Kirchleitner SV\***, Kluge M, Koenig LM, Hoerth C, Rambuscheck CA, Boehmer D, Ahlfeld J, Kobold S, Friedel C, Endres S, Schnurr M, Duewell P.  
Immunostimulatory RNA leads to functional reprogramming of myeloid-derived suppressor cells in pancreatic cancer.  
*Journal for ImmunoTherapy of Cancer* 2019; 7:288  
JIF 8,7
5. Metzger P, **Kirchleitner SV**, Boehmer DFR, Horth C, Eisele A, Ormanns S, Gunzer M, Lech M, Lauber K, Endres S, Duewell P, Schnurr M, Konig LM  
Systemic but not MDSC-specific IRF4 deficiency promotes an immunosuppressed tumor microenvironment in a murine pancreatic cancer model.  
*Cancer Immunology Immunotherapy*, 2020.  
JIF<sup>2019</sup> 5,4
6. Cai L\*, **Kirchleitner SV\***, Zhao D, Li M, Tonn JC, Glass R, Kalin RE  
Glioblastoma Exhibits Inter-Individual Heterogeneity of TSPO and LAT1 Expression in Neoplastic and Parenchymal Cells.  
*International Journal of Molecular Sciences*, 2020. 21(2).  
JIF<sup>2019</sup> 4,6

## 8.2.2 Abstracts

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden in Teilen auf Kongressen vorgestellt und im Rahmen dessen als Abstracts veröffentlicht:

1. **Kirchleitner SV**, Schrom E, Endres S, Düwell P, Schnurr M.  
Die Immuntherapie des Pankreaskarzinoms mit Liganden von RIG-I-like Helikasen induziert eine funktionelle Umprogrammierung von myeloiden Suppressor-Zellen mit reduzierter Immunsuppression.  
*Zeitschrift für Gastroenterologie* 2014; 52(08): p. KG162.  
JIF 1,1
2. Posselt L, Lazic I, Funk A, **Kirchleitner SV**, Schievenbusch S, Adunka T, Endres S, Düwell P, Rothenfusser S, Schnurr M.  
Targeting RIG-I with 5'ppp-modified RNA for immunotherapy of hepatocellular carcinoma (HCC).  
*Zeitschrift für Gastroenterologie* 2014; 52(09): p. G1.  
JIF 1,1
3. **Kirchleitner SV**, Schrom E, Endres S, Düwell P, Schnurr M.  
ITOC2–008. Melanoma differentiation-associated protein 5 (MDA5)-based tumour immunotherapy reprograms M2/G2-polarised myeloid-derived suppressor cells (MDSCs).  
*European Journal of Cancer* 2015; 51: p. S3.  
JIF 3,2
4. Metzger P, **Kirchleitner SV**, Ritter I, Endres S, Düwell P, Schnurr M.  
Surface staining of PD-1 discriminates dead from viable MDSC.  
*European Journal of Cancer* 2016.  
JIF 3,1
5. Orth M, Posselt L, **Kirchleitner SV**, Schuster J, Belka C, Schnurr M, Lauber K.  
Exploiting novel combined-modality approaches for treatment of highly aggressive, invasive pancreatic carcinomas.  
*Strahlentherapie und Onkologie* 2016.  
JIF 2,7
6. Orth M, Posselt L, **Kirchleitner SV**, Schuster J, Belka C, Schnurr M, Lauber K.  
OC-0220: Exploiting novel combined-modality approaches for treatment of highly aggressive pancreas carcinomas.  
*Radiotherapy and Oncology* 2017; 123: p. S110.  
JIF 4,9
7. Metzger P\*, **Kirchleitner SV\***, Kluge M, König LM, Endres S, Friedel CC, Schnurr M, Düwell P.  
Activation of MDA5 improves anti-tumor therapy and reduces suppressive capacity of myeloid-derived suppressor cells.  
*Proceedings on Cancer-Immuno-Oncology* 2018: DOI: 10.18416/CIO.2018.1810042.

- 
8. Orth M, Posselt L, **Kirchleitner SV**, Schuster J, Stegen B, Belka C, Schnurr M, Lauber K.  
Targeted inhibition of DNA-dependent protein kinase (DNA-PK) and fractionated irradiation as a novel approach for combined-modality treatment of pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC).  
*Strahlentherapie und Onkologie* 2018.  
JIF 2,7
  
  9. Orth M, Schuster J, Posselt L, **Kirchleitner SV**, Belka C, Schnurr M, Lauber K.  
Inhibition of DNA-dependent Protein Kinase and Fractionated Irradiation as a New Treatment Approach for Ductal Pancreatic Adenocarcinoma (PDAC).  
*Strahlentherapie und Onkologie* 2019.  
JIF<sup>2018</sup> 2,7

## 8.2.3 Wissenschaftliche Vorträge und Poster

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden in Teilen auf folgenden Kongressen vorgestellt und im Rahmen dessen veröffentlicht:

1. **Kirchleitner SV**, Duewell P, Schnurr M.  
Myeloide Suppressorzellen (MDSC) als Zielstrukturen für die Immuntherapie des Pankreaskarzinoms mittels bifunktionaler siRNA  
*5. DoktaMed*, 2013, München
2. **Kirchleitner SV**, Schrom E, Endres S, Düwell P, Schnurr M.  
Die Immuntherapie des Pankreaskarzinoms mit Liganden von RIG-I-like Helikasen induziert eine funktionelle Umprogrammierung von myeloiden Suppressor-Zellen mit reduzierter Immunsuppression  
*6. DoktaMed*, 2014, München
3. **Kirchleitner SV**, Schrom E, Endres S, Duewell P, Schnurr M.  
MDA5-based immunotherapy can reprogram tumor myeloid-derived suppressor cells (MDSC) from a M2/G2 phenotype to a M1/G1 phenotype and reduce suppressive function  
*12th Cancer Immunotherapy Conference (CIMT)*, 2014, Mainz
4. **Kirchleitner SV**, Schrom E, Endres S, Duewell P, Schnurr M.  
Myeloide Suppressorzellen als Zielstrukturen für die Immuntherapie des Pankreaskarzinoms durch MDA5 Aktivierung  
*FöFoLe Statusseminar 2014*, Herrsching am Ammersee
5. **Kirchleitner SV**, Schrom E, Endres S, Duewell P, Schnurr M.  
Die Immuntherapie des Pankreaskarzinoms mit Liganden von RIG-I-like Helikasen induziert eine funktionelle Umprogrammierung von myeloiden Suppressor-Zellen mit reduzierter Immunsuppression  
*Jahresversammlung der DGVS 2014*, Leipzig
6. Duewell P, **Kirchleitner SV**, Endres S und Schnurr M.  
RIG-I-like helicase-mediated reprogramming of myeloid-derived suppressor cells as novel therapeutic strategy for pancreatic cancer  
*13th Cancer Immunotherapy Conference (CIMT)*, 2015, Mainz
7. **Kirchleitner SV**, Schrom E, Endres S, Duewell P, Schnurr M.  
Die Immuntherapie des Pankreaskarzinoms mit Liganden von RIG-I-like Helikasen induziert eine funktionelle Umprogrammierung von myeloiden Suppressor-Zellen mit reduzierter Immunsuppression  
*Jahresversammlung der DGVS 2015*, Warnemünde
8. Metzger P, **Kirchleitner SV**, Ritter I, Endres S, Duewell P und Schnurr M.  
Surface staining of PD-1 discriminates viable cell populations  
*14th Cancer Immunotherapy conference (CIMT)*, 2016, Mainz
9. **Kirchleitner SV**, Duewell P und Schnurr M.  
Melanoma differentiation-associated protein 5 (MDA5)-mediated reprogramming of myeloid-derived suppressor cells (MDSC) as novel therapeutic strategy for pancreatic cancer  
*Myeloid Suppressors Conference 2016*, Philadelphia, USA



10. Metzger P, **Kirchleitner SV**, Ritter I, Endres S, Duewell P und Schnurr M.  
Anti-PD-1 monoclonal antibodies stain unrecognized marker on myeloid and tumor cells  
*Myeloid Suppressors Conference 2016, Philadelphia, USA*
11. Metzger P und **Kirchleitner SV**, Duewell P und Schnurr M.  
Melanoma differentiation-associated protein 5 (MDA5)-mediated reprogramming of myeloid-derived suppressor cells (MDSC) as novel therapeutic strategy for pancreatic cancer  
*1st i-Target Kubus Conference 2016, München*
12. **Kirchleitner SV**, Metzger P, Duewell P und Schnurr M.  
Einfluss von RIG-I-like Helikasen auf die funktionelle Differenzierung von myeloiden Suppressorzellen (MDSC) im Pankreaskarzinom  
*Doktoranden Symposium 2016 der Deutsche Krebshilfe, Bonn*
13. Metzger P und **Kirchleitner SV**, Hörth C, Endres S, König LM, Schnurr M und Duewell P.  
Activation of RIG-I-like helicases improves anti-tumor therapy and reduces suppressive capacity of myeloid-derived suppressor cells  
*3rd Immunoradiation Conference (Immunorad), 2018, Paris, Frankreich*
14. Metzger P, **Kirchleitner SV**, Hörth C, König LM, Endres S, Duewell P und Schnurr M.  
Irf4-deficiency expands myeloid cells and accelerates tumor growth in an orthotopic pancreatic cancer model  
*1st European Symposium on Myeloid Regulatory Cells in Health and Disease, 2018, Essen*
15. Metzger P, **Kirchleitner SV**, Zukowska M, Saur D, Endres S, Duewell P und Schnurr M.  
Pancreatic tumor cell line-derived factors inhibit dendritic cell differentiation and induce a T cell suppressive program in myeloid cells  
*16th Cancer Immunotherapy Conference (CIMT), 2018, Mainz*
16. **Kirchleitner SV** und Metzger P, Duewell P und Schnurr M.  
RIG-I-like helicases signaling induced alteration of myeloid-derived suppressor cells phenotype and function unleashes tumor immune control in murine pancreatic cancer  
*16th Cancer Immunotherapy Conference (CIMT), 2018, Mainz*

### 8.3 Eidesstattliche Versicherung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation

**“RIG-I-like receptor-basierte Immuntherapie des Pankreaskarzinoms und die  
Rolle von *myeloid-derived suppressor cells*”**

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe. Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Unterschrift Doktorandin

München, 12.12.2020

Sabrina V. Kirchleitner

## 8.4 Kumulative Dissertation

Bestätigung gem. § 4a Abs. 3 und 5 der Promotionsordnung für die Promotion zum Dr. med., Dr. med. dent. und Dr. rer. biol. hum. und gem. § 7 Abs. 4 der Promotionsordnung für die Promotion zum Dr. rer. nat. an der Medizinischen Fakultät

Titel der Publikationen:

1. RIG-I-like helicases induce immunogenic cell death of pancreatic cancer cells and sensitize tumors toward killing by CD8<sup>+</sup> T cells.
2. Targeted activation of melanoma differentiation-associated protein 5 (MDA5) for immunotherapy of pancreatic carcinoma.
3. Immunostimulatory RNA leads to functional reprogramming of myeloid-derived suppressor cells in pancreatic cancer

Hiermit bestätige ich, dass keiner der zur Promotion eingereichten Fachartikel Gegenstand einer anderen (laufenden oder abgeschlossenen) kumulativen Dissertation ist.

Unterschrift Doktorandin

München, 12.12.2020

Sabrina V. Kirchleitner